

Schnelltest zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung, das auf der quantitativen Bestimmung mitogen exprimierbarer Oberflächenmarker, vorzugsweise CD69, peripher zugänglicher Zellen, z.B. Hautzellen oder Lymphozyten, (a) vor und (b) nach mitogener Stimulation erfolgt, wobei ein bestimmter Stimulationsindex a:b ein Anzeichen für Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadium oder eine Prädisposition für diese Erkrankung ist. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Kits, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens geeignet sind.

Die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung ist mit klinischen Mitteln sowie den zur Verfügung stehenden paraklinischen und apparativ-technischen Methoden allein nicht mit letzter Sicherheit zu stellen und bedarf daher stets der autoptischen Verifizierung. Insbesondere in Frühstadien der Erkrankung ist die differentialdiagnostische Abgrenzung anderer Demenzursachen oft schwierig. Gerade in diesen frühen Phasen der Erkrankung ist jedoch eine sichere Stellung der Diagnose aus zweierlei Gründen wichtig. Sie erlaubt zum einen die diagnostische Abgrenzung potentiell behandelbarer Demenzformen und kann diese damit einer effektiven Therapie zuführen, zum anderen ist sie Voraussetzung für jegliche Form der therapeutischen Intervention in den Prozess der Neurodegeneration der Alzheimerschen Erkrankung, der nur in diesen Frühstadien erfolgreich sein kann. Eine derartige diagnostische Sicherheit kann nur durch Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung, d.h. durch leicht zu bestimmende biologische Veränderungen mit einer für die Erkrankung hinreichenden Sensitivität und Spezifität, geleistet werden.

Best Available Copy

Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung haben damit zum einen diagnostischen Wert, und sollen hierbei insbesondere helfen, Risikogruppen bzw. Patienten in präklinischen Stadien und frühen klinischen Stadien sicher zu identifizieren. Zum anderen dienen Biomarker der Verlaufskontrolle und damit der Prognostik sowie der Kontrolle der Ansprechbarkeit auf therapeutische Interventionen. Ideale Biomarker sollten bestimmten theoretischen und praktischen Anforderungen genügen. Hierzu gehören insbesondere eine hohe Spezifität und Sensitivität, die Fähigkeit, präklinische Stadien zu identifizieren, sowie ein hoher positiver und negativer Vorhersagewert. Die Bestimmung der Biomarker sollte möglichst nicht-invasiv sein und den Patienten nicht belasten oder ängstigen. Die Analysen sollten preiswert sein und sich einfach, möglichst unter Bedingungen der Hausarztpraxis, durchführen lassen. Leider genügt keiner der derzeit bekannten Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung den o.g. Anforderungen. Insbesondere aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität der bekannten Biomarker sind diese als diagnostisches Hilfsmittel ungeeignet. Andere diagnostische Untersuchungen mit höherer Sensitivität und Spezifität erfordern aufwendige technische Voraussetzungen und sind daher nicht zum dezentralen Einsatz an einer größeren Patientengruppe geeignet.

Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische Problem zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung bereitzustellen, das die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung, die Erfassung von präklinischen Erkrankungsphasen sowie die differentialdiagnostische Abgrenzung der Alzheimerschen Erkrankung gegen andere Demenzen mit ausreichender Sensitivität und Spezifität erlaubt.

Die Lösung dieses technischen Problems wurde durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Es konnte ein Diagnoseverfahren entwickelt werden, das auf der Bestimmung des mitogenen Index (Aktivierungsindex) an peripher zugänglichen Zellen, wie Hautzellen oder Blutlymphozyten, des Patienten mit und ohne mitogener Stimulation beispielsweise nach immuno-magnetischer Zellseparation basiert. Die Aktivierung dieser Zellen geht mit der Oberflächenpräsentation von Aktivierungsmarkern einher, die quantitativ nachgewiesen werden können, vorzugsweise anhand von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, wobei vorzugsweise mit Antikörpern beschichtete magnetische Partikeln verwendet werden, was die magnetische Zellseparation und anschließende Quantifizierung der Anzahl der Zellen erlaubt, die diesen Oberflächenmarker vor und nach mitogener Stimulation tragen. Dieses Merkmal zeigt erkrankungsspezifische Abweichungen vom Normalbefund. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt somit die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung, die Erfassung von präklinischen Erkrankungsphasen sowie die differentialdiagnostische Abgrenzung der Alzheimerschen Erkrankung gegen andere Demenzen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung anhand einer Probe von einem Patienten, wobei dieses Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) mitogene Stimulation der peripher zugänglichen Zellen in der Probe;
- (b) quantitative Bestimmung der mitogen stimulierten Zellen innerhalb der Zellpopulation vor und nach Schritt (a) anhand von einem oder mehreren nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarkern, wobei die Oberflächenmarker tragenden Zellen von den keinen Oberflächenmarker tragenden Zellen unter Verwendung von gegen die Oberflächenmarker gerichteten Antikörpern separiert werden; und

(c) Bestimmung des Stimulationsindex als Verhältnis der Anzahl der den oder die Oberflächenflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Schritt (a);

wobei ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung ist.

Der Fachmann kennt geeignete Maßnahmen, um für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Patientenproben zu erhalten und die mitogen stimulierbare Zellen in ausreichendem Maß enthalten, beispielsweise sind geeignete Proben Hautgewebeproben, Blutproben, vorzugsweise von venösem Blut, Zellen aus dem Liquor cerebrospinalis, sowie Zellen aus Urin.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens, z.B., bei Verwendung einer Blutprobe, erfolgt zur Stabilisierung vor den weiteren Verfahrensschritten die Zugabe einer koagulationshemmenden Verbindung, z.B., Natriumcitrat oder Heparin.

Der hier verwendete Begriff „Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung“ umfasst auch die Verlaufskontrolle und somit Prognostik, die Kontrolle der Effizienz therapeutischer Maßnahmen und die differentialdiagnostische Abgrenzung der Erkrankung von anderen Demenzen.

Der hier verwendete Begriff „peripher zugängliche Zellen“ bezieht sich auf Zellen, die ohne operative Eingriffe, oder aber (minimal)invasiv dem menschlichen Organismus entnommen werden können und dazu zählen beispielsweise Hautzellen und Lymphozyten der peripheren Bluts, wobei letztere für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt sind.

Die mitogene Stimulation zur Erzielung der Expression der Expression von Oberflächenmarkern kann durch bekannte Stimulatoren erfolgen, wie z.B. Phytohämagglutinin (PHA), Protein A, PWM oder andere trophisch oder mitogen wirkende Verbindungen. Die Stimulation kann durch Zugabe der Einzelverbindungen oder durch kombinierte Zugabe erfolgen.

Der Fachmann kennt geeignete experimentelle Bedingungen für eine solche Stimulation, z.B. hinsichtlich der Konzentration der verwendeten Mitogene, Dauer der Stimulation und sonstigen Inkubationsbedingungen. Dabei sollte die Stimulation in geeigneten Gefäßen erfolgen, die einen ausreichenden Gasaustausch zulassen. Die Konzentrationen der jeweiligen Stimulationsagentien sollten sich im physiologischen Bereich befinden, der z.B. für PHA 1µg/ml bis 20µg/ml, für PWM 1µg/ml bis 50µg/ml und für Protein A 10µg/ml bis 200µg/ml beträgt. Die Dauer der Stimulation richtet sich nach der Geschwindigkeit der Expression des zu untersuchenden Moleküls. Für bestimmte Untersuchungen können aber auch Stimulationszeiten von 2 bis 24 Stunden erforderlich sein; im Falle von CD69 ist eine Stimulationsdauer von 4 Stunden optimal. Die Stimulation sollte unter physiologischen Bedingungen erfolgen und kann z.B. in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5%CO₂ durchgeführt werden.

Der Fachmann kennt auch geeignete Oberflächenmarker, anhand derer sich eine mitogene Stimulation manifestiert, z.B. CD69, CD25, CD45RO, CD63 oder HLA-DR, wobei der Oberflächenmarker CD69 bevorzugt ist. Es kann für die erfindungsgemäßen Zwecke auch die Bestimmung einer Kombination von Oberflächenmarkern erfolgen oder die weitere Spezifizierung der anhand eines bestimmten Oberflächenmarkers, z.B. CD69, separierten Zellen hinsichtlich weiterer Subpopulationen, z.B. anhand von (z.B. CD4⁺- und/oder CD8⁺ -und/oder CD19⁺ und /oder CD56⁺) Subpopulationen.

Der Stimulationsindex (Aktivierungsindex) ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl der den oder die Oberflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Stimulation. Ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, stellt ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder eines Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung dar. Ein Stimulationsindex, der weniger als das 10-fache der unstimulierten Kontrollprobe beträgt deutet nicht auf Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung hin. Die Bestimmung der Oberflächenmarker tragenden Zellen kann nach üblichen Verfahren erfolgen, z.B., Western-Blot, ELISA, RIA, FACS, LSC etc.

Vorzugsweise erfolgt zur Bestimmung der Oberflächenmarker tragenden Zelle deren Abtrennung von den keinen Oberflächenmarker oder andere Oberflächenmarker tragenden Zellen anhand charakteristischer Zellmerkmale.

In dem Diagnoseverfahren der vorliegenden Erfindung erfolgt die Separierung der Oberflächenmarker tragenden Zellen von den nicht Oberflächenmarker tragenden Zellen durch gegen (den) die gewünschten Oberflächenmarker gerichtete Antikörper. Dabei kann es sich bei den dafür geeigneten Antikörpern um monoklonale, polyklonale oder synthetische Antikörper oder Fragmente davon handeln. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „Fragment“ alle Teile des monoklonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder „single chain Fv“-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt, viele gegen Oberflächenmarker gerichtete Antikörper sind auch im Handel erhältlich.

In der am meisten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens ist der (sind die) Oberflächenmar-

ker-spezifischen Antikörper an magnetische Partikel, beispielsweise paramagnetische Perlen (z. B. erhältlich von DYNAL A.S, P.O.Box 158 Skøyen, N-0212 Oslo, Norway) gebunden, was die Separation der Zellen mit den entsprechenden Oberflächenmarkern über immuno-magnetische Separation gemäß gängiger Verfahren erlaubt.

Der Stimulationsindex kann dann dadurch bestimmt werden, dass die Menge der mittels des gewünschten Oberflächenmarkers separierten Zellen anhand ihres Nukleinsäuregehalts und/oder Proteingehalts mittels gängiger Verfahren bestimmt wird, z.B. nach Lyse der Zellen durch spektrophotometrische Bestimmung des Nukleinsäure- bzw. Proteingehalts oder nach Anfärbung der Nukleinsäure mittels spezifischer Farbstoffe, z.B. Ethidiumbromid, Propidiumjodid, Acridinorange, DAPI etc über photometrische Quantifizierung. Unter Verwendung von Eichkurven kann aus dem Protein- und/oder Nukleinsäuregehalt der Probe die Zellzahl rechnerisch ermittelt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Kit, der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens geeignet ist und wenigstens folgende Bestandteile enthält:

- (a) Eine Verbindung zur mitogenen Stimulation;
- (b) mindestens einen gegen einen nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarker gerichteten Antikörper, vorzugsweise einen an ein magnetisches Partikel gebundenen Antikörper.

Vorzugsweise enthält der erfindungsgemäße Kit außerdem

- (a) mindestens ein Reaktionsgefäß;
- (b) eine koagulationshemmende Verbindung und/oder einen Puffer zur Zell-Lyse;
- (c) einen Puffer zur Fixierung der Zellen;

- (d) Substanzen die für die quantitative Ermittlung der DNA- bzw. Proteinkonzentration erforderlich sind, sowie vorgefertigte Lösungen zur Herstellung einer Eichkurve;
- (e) einen Magneten zum Separieren der an die Magnetpartikel gebundenen Zellen (enthalten sofern ein an ein magnetisches Partikel gebundener Antikörper eingesetzt wird); und
- (f) ein Reagenz zum Ablösen gebundener magnetischer Partikel (enthalten sofern ein an ein magnetisches Partikel gebundener Antikörper eingesetzt wird)

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits ist der Antikörper ein anti-CD69-Antikörper. Der Kit kann außerdem noch zusätzlich oder anstelle des anti-CD-69-Antikörpers einen anti-CD4- und/oder anti-CD8-Antikörper enthalten.

Schließlich kann der erfindungsgemäße Kit gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren geeigneten weiteren Nachweismitteln ,z.B., fluoreszenzgekoppelten Primärantikörpern, sekundären Antikörpern, Nachweismitteln für Proteine und/oder Nukleinsäuren, z.B. einem interkalierenden Farbstoff etc., vorliegen.

Beispiel

Bestimmung des mitogenen Stimulationsindex anhand CD69 bei Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung

Bestimmungen bisher bekannter Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung, die sich am lebenden Patienten durchführen lassen (Biomarker), zeigen nur eine ungenügende Sensitivität und Spezifität oder sind aus Kostengründen oder Gründen des hohen Aufwandes der Testanordnung nicht für Untersuchungen mit hohen Fallzahlen geeignet. Mit klinischen Mitteln beträgt die dia-

gnostische Sicherheit nur 80% bis 90% und bereitet insbesondere in Erkrankungsfrühphasen differential-diagnostische Schwierigkeiten. Die Erkennung von präklinischen Erkrankungsphasen ist aufgrund des Fehlens eines geeigneten Biomarkers derzeit nicht möglich.

Den neurodegenerativen Veränderungen liegen bei der Alzheimer-schen Erkrankung gestörte Prozesse der intrazellulären Vermittlung trophischer und mitogener Signale zugrunde. Diese Störungen der intrazellulären Signaltransduktion sind nicht auf das Nervensystem beschränkt. Sie lassen sich in ähnlicher Weise auch an Hautzellen sowie an Lymphozyten des peripheren Blutes dieser Patienten finden. Aufgrund ihrer Erkrankungsspezifität besitzt diese Veränderung diagnostischen Wert und eignet sich als Biomarker.

Im nachfolgenden Beispiel erfolgte die Ermittlung, ob die für die Alzheimersche Erkrankung typische Störung der intrazellulären Vermittlung trophischer und mitogener Signale vorliegt, durch immuno-magnetische Zellseparation CD69 präsentierender Lymphozyten vor und nach mitogener Stimulation.

Die Gewinnung des Blutes erfolgte durch Venenpunktion unter Verwendung eines Blutentnahmesystems der Firma SARSTEDT. Das Blut wird dabei während der Entnahme durch im Blutentnahmesystem integrierte Antikoagulantien, wie z.B. Natriumzitrat oder Natrium-Heparin stabilisiert. In dieser Form kann es 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die Stimulationsexperimente wurden in gut zu belüftenden Reaktionsgefäßen, wie z.B. einer 24 well Suspension-culture-plate der Firma Greiner bio-one durchgeführt. Dafür wurden zu je 400µl stabilisiertem Vollblut die Mitogene Phytohaemagglutinin (PHA), Protein A und Pokeweed-Mitogen (PWM) jeweils einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. Die Endkonzentrationen der jeweiligen Mitogene lag im physiologischen Bereich

und betrug in diesem Beispiel für PHA 12 µg/ml, für Protein A 50 µg/ml und für PWM 4 µg/ml. Die Stimulation erfolgte unter physiologischen Bedingungen bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% in einem Begasungsbrutschrank für eine Dauer von 4 Stunden. Jeweils 100 µl des stimulierten Vollblutes wurden mit verschiedenen Antikörper-beschichteten Magnetpartikeln inkubiert. In diesem Beispiel wurden anti-CD4 sowie anti CD8 beschichtete Magnetpartikel der Firma DYNAL verwendet. Die entsprechenden Magnetpartikel wurden der jeweiligen Probe im Überschuß (10 µl Magnetpartikel-Suspension) zugesetzt, um eine vollständige Isolation der entsprechenden Lymphozyten-Subpopulation zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die entsprechende Lymphozyten-Subpopulation magnetisch separiert und nach darauffolgenden Waschschritten in 100 µl definiertes Medium, in diesem Beispiel RPMI1640, versetzt mit 1% fötalem Kälberserum (FKS), überführt. Das Ablösen der gebundenen Magnetpartikel erfolgte in diesem Beispiel unter Verwendung von jeweils 10 µl DETACHaBEAD der Firma DYNAL. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die abgelösten Magnetpartikel separiert und die Zellsuspension nach mehrmaligem Waschen in ein definiertes Medium, in diesem Beispiel RPMI1640 aufgenommen. Durch Zugabe eines spezifischen Lysepuffers wurden die Zellen aufgeschlossen, die DNA mit spezifischen DNA Farbstoffen, wie z.B. Ethidiumbromid, Propidiumiodid, Acridinorange oder DAPI markiert und diese im Anschluß photometrisch quantifiziert. Unter Verwendung der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford wurde der Proteingehalt der Proben verglichen. Unter Verwendung von Eichkurven wurde aus dem DNA- und/oder Proteingehalt der Probe die Zellzahl rechnerisch ermittelt. Diese Vorgehensweise erlaubte einen direkten Rückschluß auf die Zellzahl. Die Berechnung des Quotienten aus der Zahl CD69 präsentierender Zellen vor und nach mitogener Stimulation (Stimulationsindex) gab Aufschluss über Veränderungen mitogener Stimulierbarkeit dieser Zellen.

Ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, ist ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung. Ein Stimulationsindex, der weniger als das 10-fache der unstimulierten Kontrollprobe beträgt, deutet nicht auf Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung hin.

In einem weiteren Experiment erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes der Probe, sowie die Bestimmung des DNA-Gehaltes ohne Zugabe von DNA-färbenden Substanzen zur quantitativen Ermittlung der CD69-präsentierenden Zellen. In diesem Fall wurde die Absorption von DNA bzw. Protein von Licht einer bestimmten Wellenlänge (z.B. 260 nm bzw. 280 nm) gemessen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung anhand einer Probe von einem Patienten, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

(a) mitogene Stimulation der peripher zugänglichen Zellen in der Probe;

(b) quantitative Bestimmung der mitogen stimulierten Zellen innerhalb der Zellpopulation vor und nach Schritt (a) anhand von einem oder mehreren nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarkern, wobei die Oberflächenmarker tragenden Zellen von den keinen Oberflächenmarker tragenden Zellen unter Verwendung von gegen die Oberflächenmarker gerichteten Antikörpern separiert werden;

(c) Bestimmung des Stimulationsindex als Verhältnis der Anzahl der den oder die Oberflächenflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Schritt (a),

wobei ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe eine Blutprobe ist und die Zellen Lymphozyten sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Oberflächenmarker CD69 ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die CD69⁺-Zellen hinsichtlich CD4⁺- und/oder CD8⁺-Subpopulationen weiter spezifiziert werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei vor Schritt (a) die Stabilisierung des Bluts durch eine oder mehrere koagulationshemmende Verbindungen erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Stimulation der Zellen durch PHA, Protein A oder PWM erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Antikörper in Schritt (b) an magnetische Partikel gebunden sind und die Separation über immuno-magnetische Separation erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Stimulationsindex über die Bestimmung des Proteingehalts und/oder Nukleinsäuregehalts der Oberflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Schritt (a) bestimmt wird.
9. Kit zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung, wobei der Kit folgende Bestandteile enthält:
 - (a) Eine Verbindung zur mitogenen Stimulation; und
 - (b) mindestens einen gegen einen nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarker gerichteten Antikörper.
10. Kit nach Anspruch 9, der außerdem enthält:
 - (c) eine koagulationshemmde Verbindung; und/oder
 - (d) einen Puffer zur Zell-Lyse.
11. Kit nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Antikörper ein an ein magnetische Partikel gebundener Antikörper ist.
12. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei der Antikörper ein anti-CD69-Antikörper ist.
13. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 12, der außerdem einen anti-CD4- und/oder anti-CD8-Antikörper enthält.

| | |
|---------|------------------|
| Interr | I Application No |
| PC1 / L | 2004/010889 |

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 GOIN

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | <p>STIELER JENS T ET AL: "Impairment of mitogenic activation of peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease" NEUROREPORT, vol. 12, no. 18, 21 December 2001 (2001-12-21), pages 3969-3972, XP008039358 ISSN: 0959-4965 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p> | 1-13 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

- * document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * earlier document but published on or after the international filing date
- * document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

23 November 2004

Date of mailing of the international search report

08/12/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schalich, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/010889

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | <p>SHALIT F ET AL: "T LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND ACTIVATION MARKERS CORRELATE WITH SEVERITY OF ALZHEIMER'S DISEASE" CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 75, no. 3, June 1995 (1995-06), pages 246-250, XP002034786 ISSN: 0090-1229 the whole document</p> | 1-13 |
| A | <p>LOMBARDI V R M ET AL: "Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, vol. 97, no. 1-2, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 163-171, XP002307209 ISSN: 0165-5728 the whole document</p> | 1-13 |
| X | <p>DE 199 36 035 A (UNIV LEIPZIG) 8 February 2001 (2001-02-08) claim 2; figure 2; example 1</p> | 1-13 |
| X | <p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 1998, ANDROSOVA L V ET AL: "'Correlation between functional activity of lymphocytes in patients with Alzheimer's dementia and their response to therapy!" XP002307210 Database accession no. NLM9634733 abstract & ZHURNAL NEVROLOGII I PSIKHIATRII IMENI S.S. KORSAKOVA / MINISTERSTVO ZDRAVOOKHRANENIIA I MEDITSINSKOI PROMYSHLENNOSTI ROSSIISKOI FEDERATSII, VSEROSSIISKOE OBSHCHESTVO NEVROLOGOV 'I! VSEROSSIISKOE OBSHCHESTVO PSIKHIATROV. 1998, vol. 98, no. 5, 1998, pages 43-46, ISSN: 0044-4588 abstract</p> | 1,2 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter al Application No
PCT/EP2004/010889

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 1995, PONOMAREVA N V ET AL: "Neuroimmune interactions in normal aging and in Alzheimer disease!" XP002307211 Database accession no. NLM8664599 abstract & VESTNIK ROSSIISKOI AKADEMII MEDITSINSKIKH NAUK / ROSSIISKAIA AKADEMIIA MEDITSINSKIKH NAUK. 1995, no. 12, 1995, pages 27-32, ISSN: 0869-6047</p> | 1,2 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/010889

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE 19936035 A | 08-02-2001 | DE 19936035 A1 | 08-02-2001 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ☐ als Aktenzeichen
PCT/EP2004/010889

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | STIELER JENS T ET AL: "Impairment of mitogenic activation of peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease" NEUROREPORT, Bd. 12, Nr. 18, 21. Dezember 2001 (2001-12-21), Seiten 3969-3972, XP008039358 ISSN: 0959-4965 das ganze Dokument ----- -/-- | 1-13 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. November 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/12/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schalich, J

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | <p>SHALIT F ET AL: "T LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND ACTIVATION MARKERS CORRELATE WITH SEVERITY OF ALZHEIMER'S DISEASE"</p> <p>CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 75, Nr. 3, Juni 1995 (1995-06), Seiten 246-250, XP002034786</p> <p>ISSN: 0090-1229</p> <p>das ganze Dokument</p> | 1-13 |
| A | <p>LOMBARDI V R M ET AL: "Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals"</p> <p>JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, Bd. 97, Nr. 1-2, 1. Juni 1999 (1999-06-01), Seiten 163-171, XP002307209</p> <p>ISSN: 0165-5728</p> <p>das ganze Dokument</p> | 1-13 |
| X | <p>DE 199 36 035 A (UNIV LEIPZIG)</p> <p>8. Februar 2001 (2001-02-08)</p> <p>Anspruch 2; Abbildung 2; Beispiel 1</p> | 1-13 |
| X | <p>DATABASE MEDLINE 'Online!</p> <p>US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 1998,</p> <p>ANDROSOVA L V ET AL: "'Correlation between functional activity of lymphocytes in patients with Alzheimer's dementia and their response to therapy!"</p> <p>XP002307210</p> <p>Database accession no. NLM9634733</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>& ZHURNAL NEVROLOGII I PSIKHIATRII IMENI S.S. KORSKOVA / MINISTERSTVO ZDRAVOOKHRANENIIA I MEDITSINSKOI PROMYSHLENNOSTI ROSSIISKOI FEDERATSII, VSEROSSIISKOE OBSHCHESTVO NEVROLOGOV 'I! VSEROSSIISKOE OBSHCHESTVO PSIKHIATROV.</p> <p>1998,</p> <p>Bd. 98, Nr. 5, 1998, Seiten 43-46,</p> <p>ISSN: 0044-4588</p> <p>Zusammenfassung</p> | 1,2 |

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter
iales Aktenzeichen
PCT/EP2004/010889

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | <p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 1995, PONOMAREVA N V ET AL: "'Neuroimmune interactions in normal aging and in Alzheimer disease!" XP002307211 Database accession no. NLM8664599 Zusammenfassung & VESTNIK ROSSIISKOI AKADEMII MEDITSINSKIKH NAUK / ROSSIISKAIA AKADEMIIA MEDITSINSKIKH NAUK. 1995, Nr. 12, 1995, Seiten 27-32, ISSN: 0869-6047</p> <p>-----</p> | 1,2 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/010889

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 19936035 A | 08-02-2001 | DE 19936035 A1 | 08-02-2001 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.